

NUCLEIC ACID PROBES**Publication number:** JP4501959T**Publication date:** 1992-04-09**Inventor:****Applicant:****Classification:****- International:** C12Q1/44; C12N15/10; C12Q1/48; C12Q1/68; G01N33/543; C12Q1/44; C12N15/10; C12Q1/48; C12Q1/68; G01N33/543; (IPC1-7) C12N15/10, C12N15/11, C12Q1/44; C12Q1/48, C12Q1/68**- European:** C12N15/10D; C12Q1/68A6, C12Q1/68B; C12Q1/68B10, C12Q1/68D4, C12Q1/68D6, C12Q1/68E; G01N33/543D4**Application number:** JP19880501005 19881121**Priority number(s):** GB1988027157 19881121, GB1988027158 19881121, GB1988027159 19881121; GB1988027160 19881121; GB1988027166 19881121; GB1988027167 19881121, GB1989006643 19890322**Also published as:**

WO9006045 (A3)

WO9006045 (A2)

EP0446260 (A3)

EP0446280 (A2)

EP0446260 (A0)

[more >>](#)[Report a data error here](#)

Abstract not available for JP4501959T

Abstract of corresponding document [WO9006045](#)

Monodisperse, superparamagnetic particles carrying a plurality of molecules of an oligonucleotide are disclosed and may be used inter alia for sequencing single stranded nucleic acids. The oligonucleotides may be covalently attached or affinity bonded to the particles either by their 3' or 5' termini. The particles have a specific gravity in the range 1.1 to 1.8 and are 1 to 10 microns in diameter. A kit for the isolation and/or processing of target nucleic acid is also disclosed.

Data supplied from the [esp@cenet](#) database - Worldwide

⑥日本国特許庁 (JP)
⑦公表特許公報 (A)

⑧特許出願公表
平4-501959

⑨Int.Cl.¹ C 12 N 15/11 15/10 C 12 Q 1/44
⑩類別記号 ZNA
⑪内装理番号 6807-4B※
⑫公表 平成4年(1992)4月9日
⑬審査請求 未請求
予備審査請求 有
⑭部門(区分) 1 (1)
⑮(全 16 頁)

⑯発明の名前 検査プローブ

⑰特 標 平2-581005
⑱出 原 平1(1989)11月21日

⑲説明文提出日 平3(1991)5月21日

⑳同 請 出 願 PCT/EP89/01419

㉑国際公開番号 WO90/06045

㉒国際公報日 平2(1990)6月14日

㉓優先権主張 ㉔1988年11月21日 ㉕イギリス(GB) ⑥8827157.2
㉔1988年11月21日 ㉕イギリス(GB) ⑥8827158.0

㉖発 明 者 ホーンズ、エリック
㉗発 明 者 コースネス、ラース
㉘出 願 人 ダイナル・エイ・エス
ノルウェー國、ヌー-0283 オスロ 2、リルアケロン 9ビ-
ノルウェー國、ヌー-0376 オスロ 3、モノリツトベイエン 12
ノルウェー國、ヌー-0212 オスロ 2、スコーエン、ビー・オ
ー・ボックス 158

㉙代 理 人 弁理士 山崎 行造 外2名
㉚定 國 A T(広域特許), A U, D E(広域特許), C H, C H(広域特許), D E(広域特許), E S(広域特許), F R(広域特許), G B, G B(広域特許), I T(広域特許), J P, L U(広域特許), N L(広域特許), N O, S E(広域特許), U S

最終頁に続く

図面の記載

- オリゴタクレオチド分子を複数重ねた、單分散、纏合性分子。
- オリゴタクレオチドがジ-アミノ酸を介して既存の共存結合している、請求の範囲第1項に記載の分子。
- 粒子がポリアクリル酸又はポリメタクリル酸のコーディングを有し、オリゴタクレオチド上のジ-アミノ酸との反応によってジ-アミド結合を形成するカルボキシル基を与える、請求の範囲第2項に記載の分子。
- オリゴタクレオチドがジ-アミノ酸を介して既存の既存の共存結合している、請求の範囲第1項に記載の分子。
- オリゴタクレオチドが、粒子上のアビシン又はストレブトアビシンに結合するD-ビメチル基によって粒子の表面に結合している、請求の範囲第1項に記載の分子。
- オリゴスクレオチドが、粒子表面のヒドロキシル基に結合する3'-ヒドロキシル基によって粒子と共に結合している、請求の範囲第1項に記載の分子。
- 既往がトト乃至1.1の範囲内である、請求の範囲第1項の重複する項のいずれか1項に記載の分子。
- サイズ範囲が1乃至14ミクロンである、請求の範囲第1項乃至第7項のいずれか1項に記載の分子。
- オリゴスクレオチドが15乃至30ミクロンの範囲の分子を有している、請求の範囲第1項乃至第8項のいずれか1項に記載の分子。

か1項に記載の分子。

- オリゴタクレオチドがポリマーである、請求の範囲第1項乃至第9項のいずれか1項に記載の分子。
- オリゴタクレオチドが、複数核糖のDNA又はRNA配列に特異的に結合する、請求の範囲第1項乃至第8項のいずれか1項に記載の分子。
- オリゴタクレオチドが、選択抗原の膜の特異的部位に結合する、請求の範囲第11項に記載の分子。
- オリゴタクレオチドが膜の某部に対しハイブリッド形成する配列及び、粒子に結合した、相同エンドタクレアーゼ活性部位を含むリンクマー配列を含む、請求の範囲第1項乃至第11項のいずれか1項に記載の分子。
- 標的抗原を不活性化し、同配列を皮膚中で粒子の吸着第1項乃至第11項のいずれか1項に記載の分子と結合させ、粒子上のオリゴタクレオチドを前記膜内抗原上のタクレオチドに対してハイブリッド形成させる方法。
- 標的抗原がDNRAであり、粒子をその吸着部位に表面に露出させ前記溶液から分離する、請求の範囲第11項に記載の方法。
- 前記粒子上に不活性化した標的抗原に、2つのプライマーのうちの1つとしてオリゴタクレオチドプローブを使用するオリゴマーを透析反応による複数処理を施し、ここで用ひるオリゴタクレオチドプローブを複数し大粒子がまことに存在しているか又はその複数個として、

特許平4-501959 (2)

- 申請を可能にするのに十分な量の前記プライマーを考える、請求の範囲第1項に記載の方法。
- (2) 一貫能技術の配列検定方法であって、
(i) 配列検定するオリゴヌクレオチド(DNA又はRNA)を遮断した通常規格半分数子母を調査する工程、
(ii) (i) 増子を4つのアリコートに分割し、各々のアリコートに、ボリメターザ、脱水ヌクレオシドトリヌクレオート、及び1つのジオキシヌクレオシドトリヌクレオートを添加する工程であって、ここでジオキシヌクレオシドトリヌクレオートは各アリコート面に異なり、プライマーが必要であれば、プライマー又はヌクレオシド又はジオキシヌクレオシドの少なくとも1がラベル付けされている工程か又は、
iii 全増子に、ボリメターザ、脱水ヌクレオシドトリヌクレオート、それそれ異なったラベルを有する4つの異なるジオキシヌクレオシドトリヌクレオート、及び、必要であればプライマー、を挿入する工程、
を行うことによって、それぞれ異なる結果と肯定のジオキシ核酸とともに至った変化を有する、一連のラベル付けされたDNA鎖を合成する工程、
(c) ラベル付けされたDNA鎖を連続させ、大きさ毎にそれを分別する工程、及び

該組物結合させる、方法。

21 オリゴヌクレオチドを、

- (i) オリゴヌクレオチド上のビオチンと該子上のアビシン又はストレブトアビシンとの反応
(ii) オリゴヌクレオチド上のDTAアミド基と該子上のカルボキシル又はトリオキシ基との反応
(iii) ヒドロキシル又はプロテクトされたヒドロキシル基を有する該子上のガリゴヌクレオチドの過酸化物的反応

によって結合させる、請求の範囲第1項に記載の方法。

- (i) 配列を検定する工程、
を含む方法、
(1) 相対核酸を単離及び／又は掩蔽するためのキットであって、
(2) 請求の範囲第1項に記載の被検粒子、及び以下に記載の：
(a) ポリメターザ
(b) 逆轉酶酵素
(c) 制限エンドヌクレオチダ
(d) 通常な緩衝液
(e) ジオキシヌクレオチドであって、そのうちのいくつかがラベルを保持しているか又は保持するように適合されているもの
(f) デオキシヌクレオチドであって、そのうちのいくつかがラベルを保持しているか又は保持するように適合されているもの
(g) オリゴヌクレオチドであって、そのうちのいくつかがラベルを保持しているか又は保持するように適合されているもの
(h) 簡便的PCR用・プライマー及び／又は3'-プライマーであって、ラベル付けされていてもよいもののうちの少なくとも1を含む、キット。
(2) 請求の範囲第1項に記載の被検粒子の調査方法であって、所定により着色の官能基を有するオリゴヌクレオチドを、粒子の表面の官能基又は分子に共存又

明　細　書

摘要　プローブ

本発明は新規性保護プローブ及びそれらを調製し使用するための方法及びキットに関する。

相應の生物活性操作においては、特定の被検物質を複合組合物から単離しこれに通常に遮蔽なプロトキスを施すことが最も多いことが多い。現行 (current) 技術の十分に長い歴史が知られている場合、その認別に通常的にハイブリド化し、その被検の場所及び／又は単離に使用することができるオリゴヌクレオチドを設計することが特に有用であることが判明した。等に、そのようなプローブを不適切して、標的核酸を含む複合組合物との接触の際に標的核酸が遮蔽され、既に分離されるようになることがある。

以前より、オリゴヌクレオチドを被検粒子に結合させることが検討されている【例えば、アドバンスト・マグネティックス (Advanced Magnetic) の米国特許第4,332,810号、アココ・コーポレーション (Acco Corporation) の欧州特許第265211(号)】。しかしながら、これらは決して単分散ではなく、通常、複数を平均浓度まで被検せられ、その際、オリゴヌクレオチドを含む開闊の混合分予の網羅への結合を可能にする装置等をもたらす機器で被覆された微細ななら枝っていた。さらに、このような被覆粒子は特に自動化された実験室では作業性がなく、実用上好ましくないことが証明されている。

特に、離液中に上って被覆された細胞膜性粒子はしばしば電気的荷電に不適切に感応し、かなりの割合が結合した液体分子とともにアスペクション中に捕捉し、同時によりも少ない液体分子の導入しか行われないことが判明している。本発明は、甲子號通常特許(1981年1月25日登録)及び乙号登録(1981年1月25日登録)で既に実施された粒子よりも大滴に捕獲率が高いということの発見に基づくものである。

本発明において、本発明者は、複数のオリゴヌクレオチドの分子を用意した樹脂表面を複数種を適用する。

本発明の粒子は、目的→直線状態に制するハイブリッド形態のグループとして使用でき、また前記オリゴヌクレオチドの複数種別複数を可能にすることにも利用できる。

オリゴヌクレオチドは一量體か二量體であるのが好ましいが、それはこれがDNAと一量體か二量體かとの両方に對してハイブリッド形成し、かつ又はよりもかなり安定だからである。このようないくつかには、オリゴ- n （これは多頭寡核苷酸の略称）とハイブリッド型とする及び單純なヌクレオチド分子中の特定の配列とハイブリッド形成する特異的DNA配列が含まれ、又は固相合成法によるDNA分子でもよい。各プローブは、オリゴ- n 又は特異的DNA配列でよい一量體DNA配列が複数粒子に複数結合したものから成ることができるが、

別の特徴は、複数粒子を作用して行われるハイブリッド形態又はその他のいかなるプロセスも、同様を對いて粒子を電気的に感應させ、粒子上の物質についてか又は上記組中の物質に結合せしむるレベル(livelvel)を分析することによって、複数個のモニターすることが容易にできるということである。

電気的荷電を應用することによる粒子の分離は、複数又は複数種を活性化する可燃性のある界面活性剤を含む遠心分離のような従来的な分離技術よりさるかに優れがある。

複数粒子は単分散でありかつ超微粒性であり、これらの場合には、粒子が含まれる液滴の濃度は大きく寄与する。粒子に選択されたプローブが液滴の反応において液滴中で荷電的になるや直前の状態であるかのように直く反応することは、本発明の最も大きな利點である。従って、例えば、複数粒子を複数する細胞膜表面からのDNA粒子の企図を約15秒以内に行うことが可能だが、これに新しアフィニティカラム(hybridity column)を使用するところ時間である。單分散粒子、即ち、ほぼ同じサイズを有する粒子、を使用することによって、複数種並びその他のパテノーターは皆に同一である。複数種粒子（即ち、永久磁性を有するのに必要な磁区(ferrite)の大きさよりも小さい適当粒子のサブ粒子を含む粒子）を使用することによって、反応中の粒子の凝集(flocculation of絮凝)を防ぐことができ、掛って、

発表平4-501959(3)

DNAの二重鎖部分を介して複数粒子に結合していくよい。本明細書中で使用される「オリゴヌクレオチド」という用語は、由來及び自生のある複数のDNA及びRNAの配列を包含する。

オリゴヌクレオチドの組合せは例示(1)DNA(611)が好ましく、(1)DNA(611)はどちら好ましい。オリゴ(6)配列と、純度の問題では、純度既存品(純度又は液滴)とを含むプローブカリゴヌクレオチドは、市販のカリAセラミック、例えばアプライド・バイオシステムズ・インク(Applied Biosystems, Inc.)のCE 2400、フォースカーシティー・リンクーンセンタードライプ(CE-1)型の各装置、のいずれかを作用することによって最も好適に調査することができる。

本発明によるプローブは、一般に、標的核酸の單離とその後の化学的及び物理的変化等の解析による操作において使用される。

複数粒子を使用することによる複数の測定は明らかに確立している。複数粒子は、標的核酸を含む複合物、例えば陰陽エキス、に添加され、洗浄され、そして最終的にリサイクル(recycle)の一方の側に引き寄せ。複数はその後不要な成分とともに除去でき、そして、結合したDNAを育する活性粒子は再循環中に再分散できる。操作工程はきつぎばやに巡回繰り返すことができる。標的核酸を得るの工程を15分以内で行うことができる。

これもまた同一かつ高い標的濃度を確実にする。従って、粒子は液槽をかけによって液槽上に均一な浓度で電離し溶液を含むことができるが、例えば物理的振動によって、その他の方法で容易に再分散させることができる。反応中の複数及び前述の均一粒子群を粗粒化への道をもたらし、このことは、工具部装置及び/又は工具部プロセスにおいて必要な多くの複雑操作の必須要件である。最小限の入力の介入しかともなわない複数の機械によって、反応及び分離が完全な信頼性をもって行えるということは最も重要な事である。

本発明において使用するのに好ましい複数粒子体、杭州新興(1981年1月25日登録)【シンテツ(1981)】に従って製造される单分散複数種複数粒子であり、この引出の請求は本明細書中に含まれる。これらの粒子中には、液滴に均一に分散しており、液滴に対する非常に均一な荷電をもたらし、これによって全ての粒子が同じ速度で移動するので、高精度のある方法、特にオートメーション、を駆使する際に重要である。さらに、液の導通性のある量が各粒子に組み込まれているので、これを、以下で説明する液槽の粒子の位置を可能にするは較めて複雑に開拓することができる。従来の、導通性の劣った生成物においては、小粒子は、選択性が付加されると時にブロック力(blocking force)を打ち出すには少なず多く残しがちでいいらしい。或いはその導通の位置はより大きな粒子へ集中ましくない効果を生じさせる。複数の自動化を

特許平4-501959(4)

れた装置は、粒子を反応領域内に保持し、一方反応は流れいかせものに、導管を復用している。この他の装置を使用するためには、活性粒子の均一な分散性及び活性性的持続は必須のものである。

本明細書中に記して使用される「單分散」という用語は、5%未満の重複率を有するナイス分散を意味するものである。

1.1乃至1.5の比を有する粒子を用いるのが好ましく、1.1乃至1.5の比が特に好ましい。本明細書で記載して使用される單分散粒子において、比重量はここでも特に同一であり、均一で予測可能な密度的分散をもたらす。

單分散粒子は、少なくとも1ミクロン、多くは少なくとも2ミクロンの粒径の粉状粒子であるのが理想であり、10ミクロン以上、多くは6ミクロン以下、例えば約1ミクロンの粒径であるのが好ましい。粒子が小さくなればなるほど活性度はゆっくりになり、反応時間が反応時間に匹敵するほど遅くなることもあり、既って効率的反応の必要性を失する。しかしながら、使用技術で使用されているような、ずっと小さい底径の散射粒子を含む平均直径が1.1乃至1.5ミクロンの粒子は、活性への影響において問題があるようには存疑しない。

プロープの粒子への結合は、直鎖的化合物結合基にストレートアビラン(Styrene)のビニル基(Vinyl)結合などによる親合力結合でよい。

プロープの結合用に、活性粒子は、ヒドロキシル、カルボキシル、アルテヒド、又はアミノ基を保持してもよい。一般に、これらは、被覆されていない部分の活性粒子結合を考慮して、上述の官能基のうちの一つを有するポリマーの表面保護を施すことによって受けられ、ポリマーの例は、ヒドロキシル基を有するためのポリダリコールをともなうアクリラレン、ヒドロキシル基を有するためのセルロース衍生物、カルボキシル基を有するためのアクリル酸又はメタクリル酸のポリマー又はコポリマー、アミノ基を有するためのアミノアルキル酸ポリマーなどである。米国特許第4,534,501号は、このような表面保護をたくさん組み合っている。

本明細書において使用する中に示す高い濃度された粒子、米国特許第4,534,501号、第4,534,510号、及び第4,534,511号に示す粒子の浓度によって製造され、これらの引物の開発は本明細書中に含まれる。見て、例えば、スナレン・ジビニルベンゼンから製造され、1.15ミクロンの直径を有するマクロ粒子[Styrene-1,4-dicarboxylic acid]多孔質高分子粒子は、HCO₂Hで処理され開孔の表面に-HCO₂H基が導入された。その底、粒子は、1.15の水溶度中に分散された。HCO₂H基によって酸化され、これは開孔の内部に不活性の新オキシヒドロキシ化合物を放出させる。初期段、特に、活性酸化熱や酸性触媒等として、粒子粒子自身にわたって存在する。HCO₂H基はH⁺との反応によってHO⁻基まで還元される。

するポリスチレンビーズである。

上記のタイプの官能化された表面を用いることによって、DNA及びRNAは活性の非活性結合が容易に起こり、特に、カルボキシル化ビーズの場合にそうであることを本明細書で発見した。

ハイブリッド形成したDNAsを次にDNAs合成に使用する場合、プロープと2リンクアービカルボキシル基を介して活性粒子に結合しているのが好ましく、このDNAsは同時にD-末端アミノ基が喪失され、これはカルボキシドカーリング剤を使用してカルボキシルとアミド結合を形成させることができる。DNAsのD-結合は、D-アミノDNAsと同様のようにD-結合して活性化されたヒドロキシル化活性粒子を保護して行うことである。

オリゴヌクレオチドDNAsのD-結合もまた化学的合成によって行うことができる。ここでもまた單分散粒子の非常に均一な底盤は、ジーン・アクシングラー[Gene Linker]のようないくつかされた合成過程での合成に間に渡る均一な反応過程をもたらす。活性粒子は、初めてヒドロキシル基又はプロテクトされたヒドロキシル基を強制されることを必要とする。オリゴルゴリ酸のダイナビーズ[DNAs]はこの目的によく適合する。しかしながら、よりな場合には、カルボキシルのようなその他の表面官能基を使用してヒドロキシル基を持つリンクアービカルボキシル基を有する。

細孔を備えし表面の活性基を導入するためには、側鎖モノマーを細孔中及び表面で重合させる。好ましい細胞の粒子の場合、底面は、-(CH₂CH=O)-_n結合を有してポリマー基團に結合している。D-結合を有する。その他の好ましい粒子は、メタクリル酸の重合によって得られた-CH₂CO基を有する。

見て、例えば、粒子中に初めて存在しているHCO₂H基を、米国特許第4,534,501号に記載されているようにタエホキシドと反応させ、その後メタクリル酸と反応させて单体ビニル基を残してよい。メタクリル酸との活性結合は、粒子で合成するDNAs粒子のような、水溶性カルボキシル基を有するポリマー底盤を用じる。同様に、HCO₂H、HCO₂H、及びDNAsビーズのようなジエボキシドとの反応の上記生成物をジアミンと反応させることによってアミノ基を導入することができ、一方既に既存のDNAsビーズのように、アミノグリセロールのようなヒドロキシルアミンとの反応はヒドロキシル基を導入する。

ダイナビーズ(Dynabeads) HCO₂H(底盤: 5ミクロン)(これはノルウェー、オスロのダイナル社から得られる)は、半島性カルボキシドで保護されており、エボキシ基とヒドロキシル基の結合位をもたらす。しかしながら、水との接触性エボキシ基をヒドロキシ基に転換する。

ダイナビーズ H-100(底盤: 2.5ミクロン)は、トトカルボキシカルボキシドとの反応によってトクロキシ基(Crotonyl group)に保護されているヒドロキシル基を有

レオチドを結合させることができる。

ジ・結合は、ジ・アミノーカラゴマクレオチドのトリル基化結合粒子へのカップリングによって行ってもよい。トリル基化結合粒子は、ダイナルTM 製のダイナビーズ R-311のようなヒドロキシル化結合粒子をトリル化することによって製造できる。トヨロキシ基の置換は、結合粒子に直接結合したジ・アミノ酸を接着する。

しかしながら、プローブがR-RNAの端部にのみ使用される場合に、プローブのD-RNA端が選択性粒子に結合してもよく、これは、DNAのD-カスフート基と粒子上のアミノ基の間にホスホルアミド結合を形成させることによって順序に行うことができる。

ビオチンラベルされたリクレオチドが市販されているので、DNA断片のD-RNA端はDNAポリメターゼを接着して断片にラベル付けでき、これらは、例えばヒドロキシル基を介して結合粒子に結合しているアビアンヌはストレートアビシンに簡単に結合できる。ビオチンラベルは、1つ以上のオーアミノカブリン酸部分のような、スペーサーーム (linker arm) によって、タグレオチドに結合させて立体障害を最小化できる。逆って、例えば、二重鎖プラスミドが回復段階で切断され、各鎖のD-RNA端にビオテインを与えるように、その末端にヒドロキシル化されたタグレオチドを持たれることができる。酸化されたリクレオチドが、その後、利の脱離性で切離されると、二重鎖R-RNAの部分は切離され、ストレ

車発明による、オリゴタグレオチドを抱持している複合性单分散粒子は、切断用の方針において使用できる。これらのいくつかを以下に記載する。

1. 由R-RNAを含む結合物からなるR-RNAの切断

複合性单分散粒子からmRNAを導く既存的方法は、ディー・マニアチス (D. Maniatis) らによって報告されている【セルキュラー・クローニング (Cellular Cloning)】、ラボラトリー・マニュアル (Laboratory Manual) 、199-1 [1997]。簡単に述べると、オリゴオキシゲン (オリゴ OX) 粒子、親和性マトリックス、典型的にはカラム、を行なうのに使用されるアガロースビーズ又はセルロースに結合させる。親和性ニキスをカラムに通し、細胞エキスがカラムを通過するにつれて、R-RNAのオリゴデニレートテール (tail) がビーズ上に不動化されたオリゴ OX に結合する。カラム洗浄し、その後のリバースカラムから洗出させる。しかしながら、通常少なくとも全時間というそれに必要な時間のために、この方法は強烈からほど遅い。

R-RNAの全ての種は、細胞溶解物中に存在するオリゴタグレアーゼによって急速に核酸分解する傾向にあるので、細胞の溶解後であるだけ速やかに中止し、cDNAに遮蔽することが重要である。そうしないと、mRNAsのみなりの割合が劣化し、完全な結合粒子のDNAに対応する全長のmRNAの比率を定めあわ

特許平4-501959 (5)

プロアビシン被覆されたビーズに結合する可能がある。ビオチル化されていない膜を除去するとビーズに結合した、ビオチンの結合したタクシオチドが離れる。

一般に、粒子を官能化し、その後のプローブを結合させるのが有利であり、官能性粒子は10⁷ ~ 10⁸ のプローブを有する。(1 ~ 100 fmol/μl)。官能性粒子の均一なサイズは、プローブが粒子と反応する面積一セグメント密度を最大にする点で有利である。均一なプローブ密度は、全てのプローブが、それらが作用される確率を半端において実質的に同じようになることを実現する点で重要である。

酵素活性が、粒子の表面に非常に近いところ、例えはアベース (base) 領域、で起こるようであることは、本発明の重要な特徴である。既って、もし酵素が酵素であるようセリン基配列中に存在し、かつプローブがその酵素活性として使用される場合、R-RNAと既っておりR-RNAを、DNAポリメターゼによって酵素位を絶えて粒子表面に向かって合成でき、逆って、それを適当なエンドヌクレアーゼによって断片に切断できることが判明した。本発明のカルボキシル化された粒子の優れ、粒子のミクロ表面が非常に不規則であり、ハイブリッド形成とその表面近くでの酵素活性に対する立体障害を緩和できるよう必要常に大きな表面積を形成させていることが判明した。一方、このようなカルボキシル化された粒子への非特異的結合は増加しない。

が問題になる。細胞エキスからmRNAを分離する既存的方法を使用すると、mRNAがカラム上にいる間に多くの始端が脱離され、認知しくない劣化をもたらす。さらに、アガロース又はセルロースのカラムは汚染され、既にいたるにその他の細胞成分によって詰まり、容易に再利用できない。

本発明の目的は、由R-RNAを得て調製する迅速な方法を提供することである。

本発明の別の特徴によれば、R-RNAをその他の成分とともに含有する複合からR-RNAを分離する方法であって、

- (1) 分離したオリゴタグレオチドプローブを用する複合の酵素活性單分散粒子を細胞液体に添加し、それによってR-RNAを脱離プローブに付しハイブリッド形成させて酵素粒子に結合させる工程、
- (2) 酵素粒子を固相表面に物理的に固定させる工程、及び
- (3) 液体とその他の成分を簡便に粒子から分離する工程、

を含む方法が提供される。

認知しくないR-RNAやウンドムはハイブリッド形成を防ぎ、ハイブリッド化荷物の量よりの過剰の酵素を充填するために、酵素粒子は最初の酵素的分離の僅少なくとも1回脱離するのが好ましい。ランダムな部分用法によって酵素されたR-RNAを除去するために、こ

特許平4-501959(6)

の浓度はストラクションシート (Stratification sheet) 条件下で、核酸を上昇させるか又はハイブリッド化中に使用するのよりも低い増強度、例えば、0.5%の省ナトリウム又は過量過酸 (carnitine solution)、を使用することによって行ってもよい。

ストラクションシート (Stratification sheet) は通常プローブの長さとそれを含むによって計算される。プローブオリゴメクレオチドを標的的是凡ての層の相図 (base map) が不正確である場合、浓度は比較的小さいストラクションシート条件下で行うべきである。一般に、浓度は、2層 (layer) の最高 (H) より 1/10 倍低い濃度で行われる。大体の場合は、上述のマニフェスの文献の 1/10 ~ 1/100 からの以下の關係に従って調整して計算できる。

(C) = H × (H + 1) / (H + C) + 0.01 / H

これはオランダでのプローブの平均長さに準じる。
(C) この 2 層 DNA の H は、算めて組み合わされた層
濃度の和が 1% を超えるごとに 1/10 で下げる。

(C) = (H1) + (H2) + ... + 10.5 log₁₀ (H1/H2)

ここで、H1 及び H2 は 2 つの複数のイオン強度で
ある。

小さいオリゴメクレオチドに対しては、この算式は以下のようにしての単純で近似できる。

H = 2 × (H1 × 流基の数) + 1 × (H2 × 流基の数)

ハイブリッド化速度は、上記増強ナトリウム溶液又は本技術分野で公知の前記試験中で行うのが好ましい。

[オクシティック・アシッド・ハイブリダイゼイション
(Oxidative Acid Hybridization)、ビー・ティー・
ハイムズ (B.T. Heimes) 及びルス・グード・ヒギンズ
(R. Higgins)、アイアルエル・グレス (TEL
Greis)、1983、を参照のこと]。

プローブからの RNA の除去は、複数な操作法、例えば、1 ~ 10 mL 中において 15 分で簡便化することによって行うことができる。

水洗弱の方針は、特定の RNA 分子の分離の前の手順精製工程としてのように、核酸溶解からそのまでの RNA 他の物質の分離に適用することができる。この目的のために、プローブはオリゴ-AT、即ち、例えば 13 乃至 30 碱基 (nt)、斯くしく 1/15 乃至 10 倍量のよう、比較的低いオキシチミシン単位の組、であるのが好ましい。このような組は、オキシチミシンの異常結合度合いは、より短い組に對しては、簡便化されたオリゴ核酸又は酵素的重合によって、容易にかつ安価に調節することがである。

オリゴ-AT は洗浄又は緩衝液等によって粒子に直接的に結合できる。この場合、ハイブリッド化された RNA はその後加熱によって溶解し、既述の原液液中所含の核酸の凡ての混合物を与える。

この実施例中の特別の利点は、もしそれがゲノム増

された直後から標示された mRNA を準備することができる。

2. 一重鎖 DNA の溶解

水洗弱による選択オリゴメクレオチド組、mRNA の場合と同様に同じ方法で、ssDNA を準備するのに使用できる。細胞溶解液のように、DNA がサンプル中に二重鎖の形態で存在する場合、精分离工程が如何に必要である。これについては、後述のオクシチミシンの作用中で説明する。

オリゴ AT プローブを保持する水洗弱の選択粒子は、特定の酸性核酸配列 (specific acidic nucleic acid sequence) の分離に有利に使用することができる。酸性核酸及びさらに、例えば、(C) 15 ~ 30 ニットのオリゴメクレールの既知の配列に射撃的な DNA 配列を含むプローブを合成できる。プローブに標的核酸とハイブリッド形成し、そしてラベル付けされたプローブは核酸の鉛の配列とハイブリッド形成する。その後、この三重鎖各体を溶解するためにオリゴ AT を過剰にしている酸性粒子を用ひる。精分离後は、オリゴ AT とオリゴ AT の間の水素結合のみが生じるようである。オリゴ AT とオリゴ AT の間の比較的高い結合体、例えば、過剰又はアニソシンチオシアネット緩衝液による洗浄によって、容易に可逆的になる。そして、ハイブリッド化溶液からの酸性粒子の除去及び洗浄の後、三重鎖結合体を粒子から溶出させることができ、さらに精分离

せんして粒子に結合する場合、DNA プローブの AT、尿素はまた過剰耳用のブロッカーとして作用して一重鎖核酸 (single stranded DNA) (ssDNA) を形成することが可能であり、ssDNA はその量、质量により、本願出願人の実験報告書第 111111.1 号及び第 1112150.1 号に対応する本願と同日付の請求出願（その内容は参考として本明細書中に組み入れられる）に従って、単離した mRNA に相対的な二重鎖 DNA (dsDNA) を脱離するのに使用できる。1 つ以上の制限エンドヌクレオチドアセチル化を有するリソカーパーを介しての ssDNA プローブの AT、尿素の結合によつて、このプローブ、組みされた ssDNA は、核酸酶等の切断によって粒子から離脱せることができる、粒子は直接的に分離される。

しかししながら、本発明の別の実施態様によれば、プローブは標的 mRNA 分子に對して特異的である。

這些粒子にカップリングされた特異的 DNA プローブの使用は、プローブとハイブリッド形成する共通の配列を有する mRNA 分子の底 (tail) を準備する際に常に都合がある。従って、例えば、朱墨ダコツリンに対するオリゴ AT のコーディングは、重い鉛と吸着の一定の範囲からの DNA プローブを用いて精離する動物エキスから準備できる。地盤的に反復する医療的研究において、遺伝子の保有された配列 (target sequence) に対応するプローブを使用して一重鎖質

特許平4-501859(7)

に複製するために、1回以上中ナイクルの複製過程を行うことができる。この装置は、透明なラベルでラベル付けされた複数個の透鏡、標準的分析システムにおける「ノイズ(noise)」との交換装置、を跨ぐ点で特徴的である。

8. 一層側の RNA は DNA の複数配列決定法

DNA の複数配列決定には 2 つの主要な方法、即ち、Maxam-Gilbert 法と Sanger ジオキシ法がある。Maxam-Gilbert 法は、1 本の鎖の D NA 鎖でラベル付けされた DNA を用いて実行する。ラベル付けされた DNA は、その後、4 つのメタクレオチドのうちで選択的に切断される。条件は、平均して毎 1 本当たり 1 つの切断が起こるようになる。これらが各段階での切断角の既知結合物において、各々の切断された鎖は、引本端からその結合物の位置のままで伸びる放射性断片を生成し、そのような断片は複数の全ての位置に対応して生じる。これらの中断片は、例えば、2D リボジゲルからなるオートラジオグラムによって分離される。切断された断片までの距離を算定することによって、全般的な配列を決定できる。Maxam-Gilbert 法は、200 基塩基以上の配列を決定するのに適用できる。

DNA 複数配列決定用の Sanger ジオキシ法は、酵素的活性の抑制された酵素を供給する。オリゴリマーゼは一層側 DNA の複数配列のコピーに適用され

る。この装置は、細胞的断片によってプライムされる (primed)。4 種のデオキシリボラクレオシドトリホスファートに加えて、脱漬(dissociation)混合物は、それらのうちの 2 つのも、3'-ジオキシ糖副産物 (lesion) を含む。このジオキシ糖副産物はデオキシリボラクレオシドリボスフュートのうちのいずれか 1 つがラベル付けされる。この混合物は次のホスホジエステル結合を形成するのに適応ない 3'-ヒドロキシ末端を欠いているので、この粗略な組み込みは新しい鎖がさらに成長するのを妨害する。結果て、ジオキシ糖副産物が D NA にある複数の位置の断片が形成される。このような複数形態停止 (block) は断片群の 4 つの組 (各々のジオキシ糖副産物に対して 1 つずつ) をゲル上で電気泳動させて、4 つのレーンのオートラジオグラムから DNA の複数配列を読み取る。最近、ジオキシ糖の純度が高まられ、これは蛍光標識試薬のオリゴラクレオシドプライマー、即ち、4 つの連続停止反応結合物の各々の中で別々に着色されたもの、への場合を含む。これらの混合物は最もめて、一層に電子供給者とするとき、それらの蛍光によって、DNA の分離したバンドが検出される。この方法では 314 基塩基までの配列を決定することができるが、一般に、約 150 基塩基のようなより短い配列が好ましい。

DNA のかなり長い配列は、この方法によって複数

配列を決定する前に、より小さい断片 (150 ~ 314 基塩基) に切断しなければならない。通常、配列データを正確に収めるためには、部分的に重なり合う断片が必要である。部分的に重なり合う断片の形成は DNA 複数配列の決定におけるもう一つの工程を作り出す。

通常使用される複数配列決定法の 1 つは、DNA 複数配列カーラーを 4 つ分離するが、これは一層 D NA 鎖を与える。配列が 300 基塩基よりも長い場合、通常の方法は、暫めの部分の複数配列を決定し、このようにして得られた複数を用いて、次の 300 基塩基部分のブライマーを合成し、そしてこの手順を DNA 複数配列の複数配列が決定されるまで繰り返す。しかしながら、テンプレート DNA を含む全ての D NA 物質がゲル上に注入されなければならないので、各回転にクローナ化 4 分アーチの新しいサンプルを使用する必要がある。複数の大断片のゲル断片を形成する必要はない。複数の複数配列決定法に対する要因がある。また、簡単、迅速、かつ自動化につながるような方法に対する要望もある。

本発明のさらにも別の面によれば、一層側複数の配列決定方法であって、

(1) 配列決定すべきオリゴスクレオチド (DNA 又は RNA) を保持する複数種の單分散粒子を複数する工程、

(2) 1 本を 4 つのアリコートに分割し、各々のア

リコートに、オリメラーゼ、組合タクレオシドトリホスファート、及び 1 つのジオキシ糖副産物を添加する工程であって、ここでジオキシ糖副産物トリホスファートは各アリコート毎に異なり、プライマーが必要であれば、プライマー又はスクレオシド又はジオキシスクレオシドの少なくとも 1 がラベル付けされている工程が又は、

(3) 1 本粒子に、オリメラーゼ、混合タクレオシドトリホスファート、それぞれ異なったラベルを有する 4 つの異なるジオキシ糖副産物トリホスファート、及び、必要であればプライマーを添加する工程、

を行なうことによって、それぞれ固なった組合と特定のジオキシ糖副産物をもった複数を有する、一層のラベル付けされた DNA 鎖を合成する工程、(4) ラベル付けされた DNA 鎖を複数させ、大まかにそれらを分別する工程、及び

(5) 配列を決定する工程、

を含む方法が提供される。

配列決定される複数種複数はオリゴスクレオチドであること、及び工程 (4) が本発明による所含されたオリゴスクレオチドを有する複数粒子の形成を含んでいることに焦点すべきである。配列決定される複数種複数が 1 本である場合は、オリメラーゼは

特許平4-501959 (B)

実するDNAを含み、複数プライマー配列を介して複数端子に結合している一端子を説くことができる。

上記のものに対して相補的なプライマーはアユール (Aureol) である。例えば、放射性ラジオチオウツリメオキシグリオチド及びボリメオキシグリオチド部分を加えアニーリングすることによってラベル付けができる。その後、上で端子を述べたような、サイズ分離を含む配列決定が行われる。配列決定は、通常、ウサギか狗のDNAの組合に對して実行され、正確なサイズ分離を可能にする。これは、ジメオキシグリオチドのノーマルラジオチドに對する比率を測定することによって達成される。合成されたcDNA断片は、柱上のカラムに巻きとることなく直接によって検出できる。その後、配列端子は、配列決定されるべき次の二連の端基尾の相補プライマーを観察するために利用できる。このようにして、本発明に對するDNA (例えば、別付図) が、部分的に、技術的方法に見られる重複の問題に遭遇すること無く、簡単に配列決定できる。

クローニングベクターに組み入れられているプライマー配列は、前段になら、従来的RFLP端基尾決定において使用されている。いわゆる、「ニバーサルプライマー (universal primer)」である。即ち、同一端子を有する全てのベクターはこのプライマーを有しており、これは、RFLP端基尾決定法による端子を取ること

DNAポリメラーゼでよく、又DNAである場合、DNAポリメラーゼはDNAポリメラーゼか又は逆轉写酶であることに対応されるであろう。

サイズ分離時に端片の同定を導入するためには、プライマー配列は、それに結合したラベルを有してもよく、長いはヌクレオシドトリキヌクレオチド又はリデオキシヌクレオチド、例えば、放射性素子でラベル付けされてもよい。端基尾子は結合したランプレート膜試験とcDNA断片の双方を結合端子とともに前段から逐次的に分離し、cDNA断片を配列決定用酵素剤中に溶解させることによって、過剰のラベルを束ねる操作ができることは、本開明の配列決定法の要領の1つである。從前の配列決定方法においては、端基尾ラベルが配列決定ゲルからの後 (1974) を経ていた。

本発明による特に可能な方法の1つは、初めに、配列決定するDNAのクローンをクローニングベクター内で形成させて配列決定用のDNAを十分に粗算算する。あらゆる種類のクローニングベクターを使用できる。その後、DNAはベクター中の適当な終端位で切断され、慣習的ベクターの結合部分 (これらは既に配列決定されている) を除いて端基尾への結合に適する端子を選択する。

二重鎖DNA肥料がD-ビオチニル化肥料を介して端子に結合している場合、それを観察させて、配列決定

ができる。

A、配列決定されるDNAは、D-ビオチニル化され、ストレプトアビシンを有する端基尾子に結合してもよい。所望により、二重鎖DNAをこのようにして結合させ、その後、底面して配列決定に必要な端子を与えてよい。これは、上端から端離されるべき分離した端が不動化された様で汚染されないようにでき、このもう一つの端は別途に配列決定して配列情報の端離を除えることができるることは往々である。プライマーは約500bpの範囲、長いで、上述のヌクレオシド及びヌクレオチド濃度に約500pmolまで、ハイブリッド形成し、次の部分を配列決定するために上述したようにさらにプライマーが必须とされる。

B、配列決定されるべきDNAは、端基尾子に結合されているランカーでハイブリッド形成でき、このランカーは一重鎖DNAのループの形態であり、ここで、D-末端がD-末端に近い領域でハイブリッド形成し、DNAのD-末端領域に對応する端基尾 (linker) を離す。このようなループは、アミノ又はヒオテン基を介して端基尾子に結合することができ、これらの基は既に結合されたカルボキシル又はストレプトアビシン基とそれ自身反応することができる。DNAは、D-末端で既にスカルボキシル化され、その後、ループのD-末端に結合してお荷物

合を与えてもよい。ループによって与えられたものの対応する端基尾を有する二重鎖DNAは、このようにして結合することができ、2つの端子はその後端によって結合でき、5'端基までの第1の部分を配列決定するためのプライマーとしてのループのD-末端を離すことができる。

C、端基尾子は、DNAのある部分に対しハイブリッド形成するプローブを形成することができる。このプローブは第1を部分の配列決定を目的のプライマーとして設立つ。プローブに対しハイブリッド形成するDNA配列は、配列決定されるDNAに割り当てられるのが好ましい。これに、後者のDNAが最初の端離DNA配列とともにベクターから切断される場合、共通に起こり得ることである。切断がcRNAの場合、プローブは、既生再構成DNAのボリヌクレオチド (PNT) に対しハイブリッド形成するD-末端カタログ-AT配列でよい。長いは、例えば、cRNAのD-末端配列が既に知られている場合、プローブは、cRNA中のある配列に対しハイブリッド形成する特異的DNA配列でもよい。

配列決定者がプライマーにラベルを追跡することを要求する場合、プライマーとしても機能するプローブは、合成されたcDNA端子をラベルとともに端子から切り取れるように、適當な封緘剤を有していなければならぬ。この製造は方法2) 及び3) の

特表平4-501959(8)

工場で使用される高集中で生き残りことができるものが育生し、既する野原性ポリマーは、すなわち、TCL-Iが最近利用できるようになった。通常のDNA中のプライマー及びDNA合成に必要な過剰のタクレオチドが複数集中で保持される場合、別々の鎖が合体され、分離され、プライマーまでアノールされ、新しい鎖が合成され、これらがただ率に上記の各工程に外する量合成度の間で収束を上下させることによって行われば、既存基質アクセスを行うことができる。この方法においては、オリジナル標的DNAsの複数が複数開発であり、既存の数百万倍の増加が比較的短い時間で行うことができる事が判明した。

しかしながら、プライマーがその他のDNAsへの再結合の場合と、それにより標的DNAsに加えてその他のDNAsが増殖されることによって、この方法は必ずしも十分に選択性ではない。プライマーの非特異的結合による、このサンプルDNAsのランダムな複数の増殖は、標的DNAsからシグナルに比較してバックグラウンドのノイズを増加させる。多くの場合、このバックグラウンドノイズのレベルの増加は、この方法の有用性に大きく影響を与える。

分子クローニングに用意して、このプライマーの特異的結合の問題が、第1の対のプライマー中に入れ子になっている第2の対のプライマーを使用することによって解決できると目撃されている。

両方に適用される。しかしながら、プローブに共有結合せず使って合成されたDNAsととともに基質に分離する、分離タクレオチドプライマーを單に適用することもできる。

4. ポリメラーゼ連鎖反応(TCL)による個的精度の増幅
單純なDNAs分子は、細胞溶解液はその他の蛋白質中に蓄めて少量でしか存在しないことが多く、既存決定の時にそのようなDNAsを個別的に増幅(TCL-I)するためには、ポリメラーゼ連鎖反応(PCR)法を使用してもよい。單純DNAsを増幅させるためにはクローンング工程を使用するよりもむしろPCR法が利用される。PCR技術においては、單純DNAsの公知の配列に特異的な一对の並立プライマーが選択され、ポリメラーゼの存在下に、各プライマーが標的DNAsテンプレートの両端まで伸びるDNAs配列を生成するように、一方はコードинг鎖の末端又はその附近でハイブリッド形成し、他方は非コードинг鎖の末端又はその附近でハイブリッド形成する。このようにして合成されたDNAsがその後、過剰的には細胞での増殖による、既存基質になるを示す場合、新たに合成した一連のDNAs配列は既存基質に存続する既存のプライマーに対してハイブリッド形成し、通常アミニーリングに通する範囲まで密度を下げた後、ポリメラーゼの存在下にさらにDNAsが合成されるが、今度は2つのプライマーの本端間に伸びない。ポリメラーゼは、既存用

4つの別個のプライマー化を圖示することによって单純な場合の大規模基質化が達成できる【ムリスケー・ペー他(1991), 1, 131, ケー・ラーラード・ニクルスキー(1991), 1, 131, メッシュ・イン・エンザイモセレクター(1991), 1, 131, トヨタ(1991), 1, 131-231～260頁、及びライシュニカ・エル・エー(Ritschell, L.A.)を参照】。エル・エー(Ritschell, L.A.)によれば、TCL-I法は、[1] 529～542頁、を参照)。エンゲルケ・ディー・アル(Engelke, D.E.)らは、オリジナルのプライマー一方に入れ子になっている、1つの新しいプライマーの子が、標的DNAsのより大きくなり一段した場所をもたらすことができる事を示唆している(Proc. Natl. Acad. Sci. USA (1993) 90: 5141～5145)。

本発明者は、本発明の結合したオリジナルタクレオチドを有する既存粒子がPCR増幅法におけるプライマーの1つとして使用できることを見出した。この反応の過度度は複数中で見られるものに近い。入れ子になった單2のプライマーが使用される場合、本発明の粒子は他のPCR法において使用することのそれが要求される。各々の場合、単離された全てのDNAsは既存基質上に不溶化され、既存の反応性を維持するために容易に溶解できる。溶解されたDNAsが最後に產生できるようだ、粒子とオリジナルタクレオチドプローブ/プライマーの間に既存基質又はその他の可逆的結合を設けるのが肝要しい。

ビオケミカル化プローブ/プライマーを使用するTCLを行なうこともでき、また複数DNAsを単離するためにアピダン又はストレプトアピダンで被覆された本発明の固相粒子を使用することもできる。

4. 標的DNAsのラベル付けとその分離

高濃度多山類第1437161号に付随する本願と同日付けの本願出願人による国際登録出願であって、その内容が参考として本願査定中には組み入れられているものには、標的基質にラベル付けする方法であって、標的核酸の公知の配列に特異的なオリゴタクレオチドプローブを抱合した既存粒子を標的核酸を含む混合物に添加し、プローブをプライマーとしてポリメラーゼ及び適切な増幅とともに使用して多様なラベル付けされたタクレオチド基質を組み入れたDNAsを合成する方法が記載されている。この方法は特に簡単で迅速であり、標的核酸を尾端的又は促進的に分析するのに使用できる。

5. セルDNAsの合成

高濃度多山類第1437161号及び第1437162号に対応する本願と同日付けの本願出願による国際登録出願であって、その内容が参考として本願査定中には組み入れられているものには、オリジナルタクレオチドプローブを抱合した既存粒子を標的核酸に対してハイブリッド化させ、プローブをプライマーとしてポリメラーゼ及び複数のタクレオチド基質とともに使用して、

特表平4-501859 (10)

cDNAを合成させることによる、cDNAの合成が推進されている。この方法は、他のcDNA分子を合成するためには、又は存在する特定の核酸の全て、例えばRNA中の全てに対応するcDNAを製造するためには使用できる。

6. 本発明の活性粒子を使用する方法のためのキット

本発明はまた本発明の方法を実施するためのキットを提供する。

A. サンプル中の全てのcDNAを単離するためのキット

(a) オリゴ-dTを担持した本発明による活性粒子及び1つ以上の

(b) ハイブリッド化装置

(c) 洗浄用緩衝液

B. サンプルから目的的の反応物又はcDNAを單離するためのキット

(d) 特異的オリゴヌクレオチドを担持した本発明による活性粒子及び1つ以上の

(e) ハイブリッド化装置

(f) 洗浄用緩衝液

C. DNA又はRNA収集用洗浄用洗浄用のキット

(g) オリゴ-dTは特異的オリゴヌクレオチドを担持した本発明による活性粒子

(h) オリメラーゼ及び1つ以上の

(i) 過酸化水素

(i) ジデオキシヌクレオチド (AT、CT、TG、及
GA) 及び

(j) テオキシヌクレオチド (A、G、C、及
T) ジデオキシヌクレオチド、テオキシヌクレオチ
ド、又はオリゴヌクレオチドであって、各々ラベ
ルを担持しているか又は担持するように適合され
ているもの。

D. オリメラーゼ過酸化酶 (H2O2) 用キット

(k) 酶的候補のDNA複数の種類的特異的DNAnア
ロープ／プライマーを担持した本発明による活性
粒子；

(l) 前述によりラベル付けされた標準的DNAnア
ロープ／ライマー；

(m) 鳥糞酸性ホリメラーゼ；及び

(n) 過酸化水素；及び

以下の実施例は説明のためにのみ与えられている。

実施例1 (1)

カルボツイミF (20) で紹介されたDNAプローブの カルボキシル粒子への結合

(1) プローブのカルボキシル粒子への結合に使用される
反応は以下の通りである。チヌク (C6) 由によって記
載された [C6, 1, 1, 1, 及びオーゲル (Opel, 1, 1, 1,)
, (1985) DNA 4, 121 ~ 131]、トヨタ保育館を經用して
アミノ酸のジーキニに導入されたアミノ酸は、強酸

のアミノ官能基を比較して、アルキルリンカーの末端
部よりアミノ基のより大きな水溶性をもたらす。共て、
粒子上のカルボキシル基はこれらの第1アミノ基と強
烈的に反応することが予想された。

100カルボキシル粒子100ナット、1,1,1イミダ
ゾール酸置換F7、0,1,1 TBCの100ナット中の100
ナットジ-HB4改質プローブを添加した。反応混合物を温
やかに振盪しながら室温で1時間煮った。

(b) DNA改質プローブをアブライド・バイオシステム・
レンセサイザー (Applied Biosystems Sequencer) と
アミノリンク (AminoLink) Eを使用して製造した。

カップリング反応は以下の通りであった。

100カルボキシル粒子100ナット、1,1,1イミダ
ゾール酸置換F7の100ナット中の100ナットジ-HB4改質プローブ、0,1,1 TBCを添加した。反応混合物をロー
ラームキサー [コールター (Carter)] 上、室温で24
時間煮ち、その後ナットとTBC (4) を含む洗浄液中
で洗浄した。

ハイブリッド形成 (ハイブリダイゼーション) 頃期：
粒子の量の結合したプローブを有するある範囲の粒子
を複数個 (24ナット) ポリ4プローブを用いてハイブリッド
形成実験において検討した。

粒子は、粒子100ナット (1 ~ 100 nmoL) の結合したプローブをカバーしていた。

24ナットオリゴヌクレオチドの量を徐々に増加

させながら、粒子に結合する量の結合したプローブと
ハイブリッド形成を観察した。TBC (4) が、結合したDNAnア
ロープを有する粒子に附してハイブリッド形成した。しか
しながら、標的分子が100ナットの範囲にあつた場合【財
團：日本ドミック、プロメガ、コーポレーション (Prospec
tive corporation)】、結合したプローブを100 nmoL有する
粒子とより密度が高くカップリングした粒子とを比較
してもハイブリッド形成率に相違はなかった。

実施例2

カルボツイミE (10) で紹介されたDNAスクリートー プローブのアミノ粒子への結合

ゴーチュラによって記載された方法【ゴーチュ、エス
・エヌ (Seal, S. S.) 及びルッソ、ジー・エフ (Russo,
G. F.)、(1985) Nuci. Acids Res. 13, 5237~5273】によ
って、プローブをカルボルアミドテート結合を介して2
種の異なるアミノ粒子に結合させた。これらの異なる粒
子に結合したDNAnの数は、1,1 ~ 1,1 マイクログラム/粒であった。

オリエクシングリコールリンカー (官能基) の末端に
アミノ基を有するDNAn粒子は、より短いリンカー (3
基子) 上にアミノ基を有するDNAn粒子よりも多量の
プローブと結合する。24ナットのようにはリンカーセもと
足くすると (原子の数 = 32)、粒子に結合するプローブ
の量の減少が観察される。これはおそらくリンカーカの二
次構造によるものであり、これが末端アミノ基をカバ

特表平1-501959 (11)

リングに利用できなくなるであろう。

特許実施例に結合したアミノ酸の量は、おそらく単位面積当たりのアミノ酸の量によって、粒子間で異なる (7 ~ 14%)。11種粒子は最も多くのブロープと共存的に結合するが (11 × 1/10)、これは最も低い非特異的結合しか示さない。

キスヘルアミゲード結合の單不対見付 [チュー・ビーコン・エフ (TBC, T. C. F.)]、ペール・マー・ニム (PML, P. M.)、及びオーゲル・エル・イー (igel E.), Prol. Apol. 31, 11, (616~6529) は、駆動表面間にによって末端結合の強度を測定するのに使用される。末端結合ブロープの量は、異なる粒子間で11~16%まで変化し、また、11種粒子が15%の末端結合したブロープを有してよりがましいようである。

本発明者らは、pH 6、室温で30時間の代わりに、pH 7 の緩衝液中で24時間反応を行うことによって、11種粒子に2倍のブロープ密度を結合させることができた。TBC のモル数を0.1とから0.15まで増加させると、11種粒子上のブロープの量が20%減少した (データは示されていない)。

二段的方法

100 μg/ml (6.6 μM) のオリゴ A (14 nt) を、2 ml のTBCドミゲードル、pH 7、0.1 M TBC に溶解させ、5分のアミノ酸子と混合し、16℃で24時間行った。

実施例1

標準的小スケールカラム中、エトナタロンでカットオフするテフロンフィルターを固め、粒子を挿入し、そしてカラムを組み立てた。

この把持体はジメチルトリチル TMT ループを含んでおらず、最初のナイカルの最初の工程でこのような化合物が導入しない場合反応が停止するので、開始手順に小さな改良を導入した。DTT 品が導入するまで標準的 (10) 小スケールカラムを使用して合成了目視した。その後、リーン・センサブラーを手順で停止し、最後段手を含む柱カラムをジーン・センサブラーに入れた。その後は装置の製造者によって規定されている標準的合成プログラムに従った。デプロタクション (deprotection) がファーマシアから提供された。脱結合装置オリゴ (11) およびカッパペプチド (11 + 11) は粒子での初期からの以下の配列を削除するために使用した。

1'-TCACTGGATCTCGGAGCTTCGATACCTGGCTGGCA-3'。

実施例2

材料と方法

調合粒子

ダイナビーズ H-800ストレプトアビジン (ダイナルヒー、Inv. TEC、P-3313 オスロ) を固体相として使用した。これらは、E. coli の収穫を有しており、ストレプトアビジンと共存結合している单分散超感性ポリマー粒子である。これらは 1.1 × 1/10 の表面密度を有していた。

T-111ブロープのトルエン酸化粒子へのカップリング

アブライド・バイオシステム・DNAシンセティザー T-111 とアミノリンクルを使用して、TBC 蛋白オリゴヌクレオチドの T-111 に導入し、T-京極に第1回、蛋白導入した。アミノリンクルはアブライド・バイオシステム社からの供給される。合成後これらのアミノ酸質オリゴヌクレオチドは直接カップリング実験に使用された。

T-トルエン酸化 T-111 粒子は、オストロのダイタル (Ostrol) AF から用意されている。

カップリング手順:

10 μl のトルエン酸化粒子を、100 μl の T-111 (Inv. TEC) 中に注入し、脱質オリゴヌクレオチドと結合し、ローラーミキサー (コールター) 上で24時間待ち、その後 T-111 (Inv. T-111) を含む10時間培養中で抽出した。

実施例2

直連合法

ダイナビーズ H-111 粒子を使用した。これらは、直径が 1.1 ミクロンで少なくとも 1.5 ミクロンであることを除いて T-240 粒子を除じてあり、T-240 粒子と同様に表面には第1-10 種を含んでいる。

合成器 (ファーマシア・ジーン・センサブラー (GeneAmp Gene 2400)) を使用して、DNA の直連合を裏面に結合させた。

3.11 ミクロンの粒子に結合させるために最小限の濃度が必要であった。アブライド・バイオシステム社からの

ビオチン結合能力

1 nmol の T-110-ビオチン [アーチャル (Archival)] を含む 100 μl 0.1 M TBC (ホスフェートと TBC を有する標準的培養: ナニアチス) を 1.0 μl の粒子 (0.1 M TEA を予め洗浄したもの) に添加し、室温で 15 分間ローラーミキサー (コールター) に入れだ。

0.1 M TEA で 2 回洗浄した後、シンクレーション計測によって結合した T-110-ビオチンの割合を測定した。

オキシカリゴヌクレオチド

アブライド・バイオシステム・DNA-RNAシンセティザー上でオキシカリゴヌクレオチドを合成した。

化学用品はアブライド・バイオシステム社から購入した。アミノリンクルを使用して、ジアミノ酸質デオキシオリゴヌクレオチドを製造した。

使用した先端グローブリンカッパ修飾ブロープは、1'-TCACTGGATCTCGGAGCTTCGATACCTGGCTGGCA-3' であった。

ブロープのビオカル化

実験によって既報されたように、ビオチン T-111 エヌタラル (T-ビオカルル)、カブロン酸のカロンチック (Citraic acid)、ラスクリン (Lascrin) を使用した。

50 μl の水中的 0.1 nmol T-110-脱質オリゴ (Inv. T-110) にラベル付け試薬液 (1.0 ナトリウム硫酸水素塩 / 試薬液、pH 9.0) を添加し、振拌した。

最終に、ジメチルホルムアミド中封鎖 T-ビオチン

X100 メスカル (100 mg/ml) を添加して反応を一晩保った。

過剰のラベル付リボヌクレオチドと脱酸基を、セファデックス G-50 スピングカラム (Sepracell G-50 100 column) 中で洗去了。
Eclips のオリゴメラーゼ、 α -[32 P]-UTP、及びランプレートとしてオリゴ (41)_{ss}による検定中のフィル (100) を使用して、リボヌクレオチド (41)_{ss}を常法ラベル付け (end labeling) した。過剰のラベルをセファデックス G-50 スピングカラムを使用して除去した。

オリゴ (41)_{ss}ダイナビーズ T-ビーズ の調査

6 x 10⁷ 6 x 10⁸ 中の 30% ビオテニル化オリゴ (41)_{ss} (41_{ss} biot) を、10 ml の PBS 中で洗浄したダイナビーズ T-ビーズストレプトアビシンと混合し、室温で 10 分間ローラー (キサー上) で振った。

6 x 10⁷ 中で 2 回洗浄した後、ビーズを 6 ml 1.1 M TEA 中で保存した。

オリゴヌクレオチドハイブリッド形成分析

T-ビーズの種々のバッチのハイブリッド形成能力を測定するための標準的分析において、エッペンドルフ (Eppendorf) 室中の 0.1 ml のビーズを 6 x 10⁷ 6 x 10⁸ で洗浄した。マダネットタック (MTC-8) やダイナル (MTC-8, オスロ) を含む各段階の粒子を調査するのに使用した。

洗浄用緩衝液の除去後、10 μl 的のオリゴ (41)_{ss}と量 (1 ~ 2 × 10⁷ - 40) の α -[32 P]-UTP のラベル付けオリ

特表平4-501959 (12)

リゴ (41)_{ss}を含むハイブリッド形成溶液 (4 x 10⁷ 6 x 10⁸) を添加した。

溶液中に混和した後、室温で 2 分間放置してハイブリッド形成させた。

ハイブリッド形成した粒子を室温で 2 x 10⁷ 6 x 10⁸ を用いて 2 回洗浄し、オリゴ (41)_{ss}に対してハイブリッド形成したオリゴ (41)_{ss}のパーセントモシンクレーション計測器中で測定した。

オリゴ RNA トランクのラベリング

オリゴ RNA チャームを有する 1 ml の 100% の RNA (プロメガ) 及び 10 ml の Ekins 缓衝液、1 ml のアシジン (Ekinsin)、1 ml の 10% のオリゴ (41)_{ss}と混合した。室温で 2 分間、1 ml の α -[32 P]-UTP、1 ml の 10% のリマラーゼ (アーチャム) 及び 50 ml の水を添加し、37°C で 10 分間作用を確認した。過剰の α -[32 P]-UTP をセファデックススピングカラムを使用して除去した。

オリゴ (41)_{ss}を原点としたダイナビーズ T-ビーズストレプトアビシンに対するオリゴ (A) の RNA とハイブリッド形成能

オリゴ (A) 緩衝液：

0.1 M LiCl、1.0 M ドリス-Cl、0.1 M EDTA、0.1 M ドラムセル緩衝ナトリウム。

中性緩衝液：

0.1 M LiCl、1.0 M ドリス-Cl、0.1 M EDTA、0.1 M EGTA。

0.1 M ドラムセル緩衝ナトリウム。

産出緩衝液 100 EDTA、4.1 M LiCl。精製 RNA やその後の用途に応じて、最後の洗浄工程を産出緩衝液中の EDTA を省略できる。

全 RNA の抽出

電気泳動槽からの全 RNA の抽出は、オーフライ (Offcut) とローディング (Rigging) のプロトコル (1980, Etkin, L. Sieben, 101 ~ 314) を使って、サルコシン (Sarkosyl) 又は、LSD 又は、尿素液を使用して行った。

RNA カップリングとハイブリッド形成能力

本稿の実験において使用したダイナビーズ T-ビーズストレプトアビシンは、粒子 1 ml 当たり 10 μg/ml のハイブリッド形成能に結合したことが判明した。

結合したハイドロキノン化オリゴ (41)_{ss}の量は、カップリング反応中にラベル付けしたシンナーを服用して測定し、純度も (1 ml 当たり 10 μg/ml のビオチンオリゴ (41)_{ss}) であることが判明した。

これらの中性化オリゴ (41)_{ss}粒子の最大ハイブリッド形成能力を検定するために、材料と方法において記載したようなく 10 μl のオリゴヌクレオチドを適用して分子量を測定した。

本稿の研究において測定し適用した T-ビーズのバッチは、100 μl カラム (41_{ss}/gel) のハイブリッド形成能力を有していることが判明した。

本稿最初の部分を測定するための対照実験において、未標的アロープ (Etkin, 1981) プローブとカップリングした粒子は、粒子 1 ml 当たり 10 μg/ml のオリゴ (41)_{ss}を未標記結合しなかった。

オリゴヌクレオチドとのハイブリッド形成強度論

過剰的に RNA が単離溶液を回転する間に、この系のハイブリッド形成強度論を研究することが必要であった。

粗縫のオリゴ (41)_{ss}原点タクレオチドに対する未標記強度の T-ビーズハイブリッド形成能力を使用して、ハイブリッド形成強度論を組み立てた。

第 1 項が示すように、ハイブリッド形成は 1 分以内に完了した。

オリゴヌクレオチドとのハイブリッド形成強度

どの程度効率的に制約核酸が温度から分離できるかを試験するためには、本発明者らは 2 つの異なる実験を組み立てた。

第 1 の実験においては、余分な量を増やしながら数々の量の有機オリゴヌクレオチド (オリゴ (41)_{ss}) を、公報の最大ハイブリッド形成能力 (10 μg/ml) を有する確定量 (100 μl) の T-ビーズに添加した。第 24 図中の結果は、標的 RNA の強度のモル比が 1 : 1 に近づいた場合でも、T-ビーズは少なくとも 10% の標的オリゴヌクレオチドと結合できることを示している。

第 2 の実験において、1 μg/ml から 100 μg/ml までの 5 つの量の T-ビーズの強度のオリゴ (41)_{ss}を 100 μl の粒子の

アリコートに該当した。落合台山中に存する植生の生長を、既報例のオリゴマクレオサドを含むプローブで10cmまで測定した。樹的オリゴマクレオサドを含まない有刺性的刺風実験においては、非特異的な結合を感知できるように、非標的的プローブをラベル付けした。2分間のハイブリッド遮蔽後、立消滅の面積工程を行い、ハイブリッド形成したオリゴ(41)の量を測定した。測定箇所中の階層は、100-1000cmのような低い標的オリゴマクレオサド群(保存する全植生の1.11%)でも、無標的オリゴ(41)群は95%以上を引き出すことを示した。

成年人获取的必需氨基酸的量

(II) ダイチペーズ結合オサ A は RNA の活性、既定、および過度発表、オリゴヌクレオチドハイブリッド形成に關して既報したような類似のもとより異能を抱き立つことによって確認した。

4-ピーズの最高ギア、ル・ル・ル・ル結合能力を発揮するために、JIS規格に10.9¹⁾等級有する1200φタクレオチドカナマイシン乾草(プロモガ)である公知の種類のJIS-ラベル付けされた丸形ル・ル・ルを使用した。巻き密度を決定するための方程式は、オリゴタクレオチド結合分析に関する既報したのと同じであるが、上式のハイブリッド形成装置を適用した。

この特定の状況下で mRNA の結合部位は、5'-ピース 1 kDa あたり 2 mol (1/3 倍) の前 RNP であることが判明した。

獨秀平4-501959 (13)

ヒトにおける mRNA のハイブリッド形成 各温度に対する性質

オーフレーラの上述の方法を使用して、ハイブリドーマ細胞株[41]を481(1)のT-17⁹細胞から全日本を播種した。オーリゴ[41]粗子に対する全日本ハイブリド形成の確率は、14以上の食性日本を供給量の7%・ラベル付けされたマウスの脾臓脾球とRBCとともに、そして158±1%のハイブリド形成確率率中の約1倍強度でT-ビーズ強力を使用して、測定した。第2回中の結果は、サンプル中のボリヤーRBCの10%近くが2分以内にビーズに付してハイブリド形成し、また14秒後には78%が底にハイブリド形成していることを示している。

細胞質転写因子からの mRNA の直接検定 内因性

ハイブリッドマザーボード上に100Wの均温板からの100W高耐熱
ヒートシンクも、日本では珍しい【デュアルベイコ】(Dualcase)、
H11-04100】中に厚分散させ、トリントン[Triton] X-100
をも5.5萬の最高温度まで活用した。1分間のリムストラッピングの後、温度を含む熱分布データを、ニッパン
ドープ(Ippan-dope) 運転分算中で10秒間スピンドルを
ペレット化した。上部熱風、2倍温度の100Wハイブリッド
形成運転中にヒーズに接触し、3分間取扱いでハイ
ブリッド形状させ、その後粒子を選択的に脱離させた。
ハイブリッド形状したMRA-Nを2~60 2014年15℃で粒
子から切り離し、電子半導体を廃棄して終了した。この

興奮においては、11%ハイブリッド馬のアリコートを、可成器、100%と、100%と、100%、100%、のトーピーズと、プローブなしの計11%のハイブリッド馬11-ストレートアビシンに振替した。トーピーズから切り替えた後、ボリュームドウのノーナンプロッグ (Nonagon Prologue) からのオフロードムラムをデントシーターでスキャンし、危険ダロブリンカバ底質アローで測定した。これらの結果は、西尾ドウルの収量がビーズの量が増加するとともに増加し、一方上層底中の草花が良くなりそれに応じて減少することを示している。東洋園園中では既に見付かっている結果は、約11%のトーピーズが11%底質からの施肥量ボリューム量以上の11倍よりも多くを供給するのに十分であることを示している。園牛の記号マークは種子に対するハイブリッド形成を表し、記号マークは上層底中に選育している可成器を表す。プローブを有していないハイストレートアビシン種子は換算可能なボリューム相当者を示さなかった。

卷之三

図版D-1細胞系「ラリル」(スウェーデン、ストックホルムのサークルイン研究所から供給された)からのmRNAの検索

オーフレームによっては、1. Blocker [17, 30] ~ [16, 11] に記載されている方法によって、1. 10^6 種類から多量 RNA を得出した。この方法を使って、4. 10^1 の粗抽出ペルトを、3. 6. 7. 過程が同じく複数段階

リ UG-1、6 リ 厚膏、0.1 メタルコシル (methylcello),
0.1 ハニーメルカブトニタノール、0.1 モトリス-エチ、
0.1 ハニ、5 リ BHT) に加熱した。その後、混合物を超音波機器で、各上アソルブ器上に

翌日、分厚紙を1,000gで封筒外周端に分離した。ペレットを適やかにTS-5脱脂石綿板上に置き、0.5kg(1kg)に均等に分け、両側面のブリードルヘッド部をカルム(1:1)で上塗り後し、その張りクロス糊を用ひておろし、反復して分離紙を接着層のエタノールと1/10体積の3%HClと複合し、何回バッチに分割し、そして使用するまで封筒で保管した。

1・17' 頭痛に相当する全R-Naのパッチのうち、
ニアサスによって1937年に111～111頁に記載された方
位に従って、オラブ¹⁷-セルロールを被覆する近東的
の日本と朝鮮半島を示した。

金具付のもう1つのバッテリを以下のマジックアングル方
式で取り外すため

附表4-501959(15)

新編

III 等電テンプレートを担す酵母細胞DNAの配列決定

ジテオキシトクレオチドで停止されていない全ての細胞の活性な西脳を、TIT-FBIの各ヌクレオチドを含む2μlのデキキシタクレオチド液(液、pH 1.5)を添加し、15分間をもとに保育することによって行った。

5%のホルムアミド溶液を添加し、全酵水中で3分間加熱して、柱不からのラベル付けされたDNAを活性させることによって、反応を停止させた。その後、前子テンブレートを酸性浴に分離し、ラベル付けされたDNAを含む5%の硫酸酸性緩衝液を緩衝液浴室用アル (buffer gradient ice-circulating bath) : アマーシュ (Amesbury) からセブロトヨール (Sebrotoyle) に入れた。

テンプレートを有する電子干渉型露光装置を用い、同装置による原判決算結果に基づく新しいプライマー規則を作成する。

最初のプライマーは全般的な配列データ、即ち、
G-TCTT-GAT-CTTC-CG-CC-C-Gに過ぎない。

2つの次のプライマー体、この複数からの中以下の配列
データに該当いた。

ブライス-2 ST-E-1CA 1AC-CC1-CC2-CHA-0-2
ブライス-3 H-EE1-EE2-EE3-EE4-EE5-EE6-EE7

これら3つのプライマーを適用することによって

（5）濃度子中心濃縮法による均一の配列検出が可能である。

1) 为方便将来可能的修改设计。

既性粒子上のストレアトアビオチンによる不動化の前に幅約2cmをPCL膜によって増幅したことと、溶液を複数回洗浄後溶液を前に露呈させ照射した結果に従って行った。合成了ヒトプロインシエリン遺伝子断片を含むプラスミド pET15b(+)をレセプターリー膜に変形させ、導入供体上に広げた。導入されたプラスミドベクトル (Tricoderma lisellae) を導入フロニーを取り、6% TAE-トリス-ゲル、M 10.0、14.0, 20.0 NE, 10.0, 14.0 MOPS-TAECL₂、10 mM β-メチルカブトキシナール、及び 100 μg/ml BSA からなるPGE 液面液¹⁴を中央に導入せしむ。サンプルを引ひきながら分間加熱し、室温まで冷却した後、上記の PGE 液面液、M 10.0, 20.0 を添加して中和した。

マルチーリンカー酵素の上流領域（ビオチン- \langle CATGATTCGGATTATAA-T \rangle ）及び下流領域（P- \langle TTCTTCAATTCGGTACGCCATCCGATATCCT-T \rangle ）のそれぞれに導入部となつて本リゴスクレオチドプライマーを用意して PCRを行った。調査者「スマーチンのファーマシイ（Pharmacia）」が記載しているように志願プライマーを実際に引いてビオチル化した。

成形品合集（100）とは、左記の PCI 周辺機器、IEEE 1394 ハードウェアの名前をまとめたもの。

ATP、並び上記の日本式の分散物サンプルから取っていった。又既発の Test-ボリュメーター（英語のアーメーリヤー (Ameliorator)）を基礎し、チタニウムプロダクタブル・ドリーブリッカ (TiteSec prepable R10 T100) TDC-テクニク、遮断力を使用して、複数オイタル断面を行った。各サイクルは、TDCでの十分幅の遮断工程、その後の30度での2分間ホルダに対するプライマー剤アーリング、黄が付いた2分間のTest-ボリュメーターによるTDC供給の遮断を含んだ。医療用混合液を1滴のパラフィン箱で分離した。目視オイタル後、混合液を1滴のパラフィンプロテクタビリ化質遮断液に接着した。上部液を除去し、不動化された二重鏡鏡面を洗浄してから15秒で15分間保持するなどとよって、専門技術に経験した、不動化液をガラスガラス反射ドロップを有するアセシジン装置などを用いて15日間前と15日間後で光学を測定した。

セラードランカス鉱床から今まで採取の標本に特徴的な
黒色風化層を含む付加された副産物岩ブレイヤー (見
図 1-17-27-28-33-34-35-36-37) を用意して、反対面研磨を行
った。第 20 号が副産物岩層ブレイヤーと並んで不規則
な凹凸があるブレイヤーである。第 21 号はトガリ、即ち
(見図 1-18) 1 次鉱 (Magnetite, Hematite, Limonite) が 12% 以
上で鉄鉱石を形成する半生鐵として岩層風化帯で発達した。
カーリング鉱石層を 65% で形成し、黒鉄鉱で充填が見
た。主成分は TiO₂/MnO₂ 鉱物層 (見図 1-17-20) と、MnO₂
を多く含む TiO₂ 鉱物層 (見図 1-18-2-3-4-5-6-7-8-9-10-11-12-13-14-15-16-17-18-19-20-21-22-23-24-25-26-27-28-29-30-31-32-33-34-35-36-37) が見

ウェーデン）を参加し、体温を100°Fに調節した。その後、この肥厚物の1/2ミリのアクリロートを1ミリのエヌフロネチド混合物と混合し、100°Fで1時間保持した。以下のマクレオチド混合物を使用した：即ち1/200のGDP、ATP、GTP、UTP、L-L-α-D-葡萄糖BP、GDPの10%、並びに1/40のトリス-HCl pH 7.5。供給物（freshening）開始の完了後、各表面の上皮膜を除去し、ストレートアビシンガロースを水で洗浄した。EDTAを10mM、pH 7.4、0.133g/mlキシレンシアノール（ciprofloxacin）液及び0.025g/mlセロソルブ（cetylpyridinium chloride）液を各表面に塗布する。アルカリメーラルブルー（Basicviolet bisel）色素由来のオレンジカルムアンドから濃度カルムアンド濃度濃度溶液の1/100を適用して、新しく合成されたオリゴヌクレオチドを着色させた。STEDで10分間保持した後、上皮膜を剥離し、アルカリ水で洗浄した。培養液瓶内に瓶中の最終濃度で増殖するように準備した自動細胞培養装置を表面に取り付けて入れた。34°Cで数分間置き、各びんを振拂する。アクリロートとガラスにより表面活性剤が表面を保護する。この通り、EDTA増殖されたDNaseが表面を電子上に不活性化でき、140mMセロソルブとオキアリマーを使用して配列保護であることを示している。

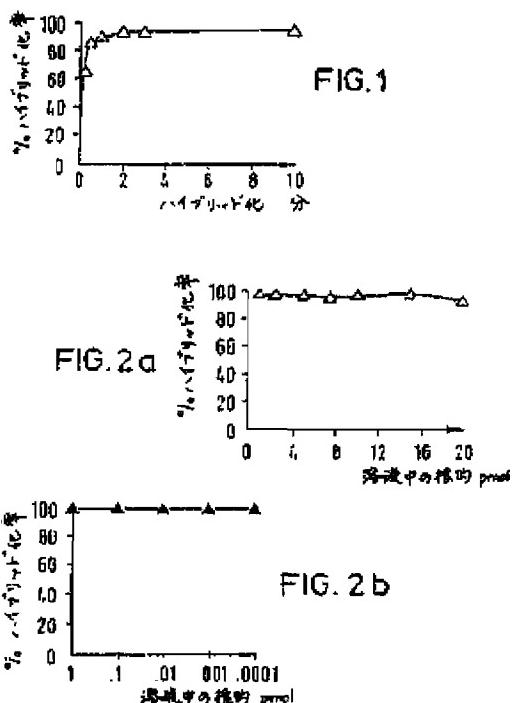


FIG. 1

FIG. 2a

FIG. 2 b

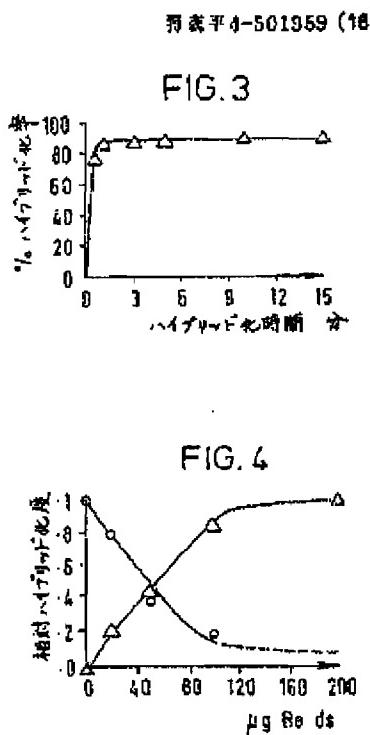


FIG. 3

FIG. 4

SEARCHED		INDEXED		MAILED		FILED	
SEARCHED	INDEXED	SEARCHED	INDEXED	SEARCHED	INDEXED	SEARCHED	INDEXED
Y	Y	EP, A, 9281399 (CIXUS ex 6-1)				1-8-11	
		7 September 1987					
		see the whole document					
Y						2-7, 15, 18	
Y, E	Y	WO, A, 8904371 (BAYER INTERNATIONAL INC.)				3, 8-11	
		18 May 1989					
		see the whole document					
Y, E						2-7, 15, 18	
Y	Y	WO, A, 8904382 (ADVANCED MATERIALS, INC.)				1, 6-11	
		7 September 1987					
		see the whole document, especially					
		page 6-1, 9-11; claims 1-7					
		4 figs, 1, 8973040 related to the application					
Y						2-6, 15, 18,	
						30, 1E	
Y							
Y		Nucleic Acids Research, vol. 15, ed. 7, 1987, IBI Press Limited, (Oxford, GB),				1-11, 17-20	
		8. SUAMI et al.: "Solid phase DNA sequencing using the bubble-bridging system",					
		page 1025-1038,					
		see the whole article, especially					
		page 1037, paragraph 1					
Y							
Y	Y	EP, A, 0330798 (CIXUS INC.)				4-11, 15, 20	
		5 August 1987					
		see the whole document					
Y							
Y	Y	EP, A, 0334126 (THE UNIVERSITY OF EDINBURGH)				15, 17-19	
		7 June 1987					
		see the whole document					
Y							

卷之四·501353 (97)

R	US. A. 3,076,774 (WILKINSON AND FARRELL) 6 May 1958 see page 4,7, claims 2,4	1,1-11
R	US. A. 3,054,267 (HARPER/STAL) 31 March 1958 see abstract, column 7, line 44 - column 8, line 6 (cited in the application)	1
A	US. A. 3,056,787 (WILKINSON) 14 April 1958 see abstract, column 7, line 44 - column 8, line 16, example 17 (cited in the application)	1
R	Chemical Abstracts, vol. 108, no. 23, June 1968, (Columbus, Ohio, U.S.), J. Tschirhart et al., "Chemical applications of heteroaromatic heterocyclic compounds", see page 232, abstract 101921a. S WATKINS INC., Ser. 3 1967, 139 (Patent Off. Pat. 3,056,787, Collected, 559-7D)	1-8
X	EP. A. 113,999 (ADVANCED MAGNETICS, INC.) 12 November 1964 see the whole document, especially page 12, lines 16-20 S US. A. 3,479,149 (cited in the application)	1,8-12
Y	EP. A. 113,999 (ADVANCED MAGNETICS, INC.) 12 November 1964 see abstract S US. A. 3,490,341 (COLUMBIA CORP.) 10 December 1966 see abstract	2-7,10-15, 18,19

Digitized by srujanika@gmail.com

SEARCHED		
V	TC, A. 473463 (SEARCHED 10/20/58) 4 October 1958 See attachment; Report 5	1-19
P,X	TC, A. 89/11546 (C. PARTLED) 10 November 1958 See the third document	1-19
	""	
T	TC, A. 89-09282 (M. VALUED) 9 October 1959 See the third document	1-19
	""	

卷之三

Invention
Abstract

The present Invention concerns the use of monodispersed superparamagnetic particles associated with a plurality of nucleic acid molecules in hybridization reactions. For the subject matter to form a unitary concept, it would be necessary that the general inventive concept as described should now have been disclosed in the prior art. In this regard, the general inventive concept underlying the present invention is the application to it has already been made in the state of art as illustrated by EP 0261844. This document teaches the use of superparamagnetic particles associated with at least one nucleic acid molecule and are capable of suspending themselves in aqueous media which are immobile. These are spherical and generally have a diameter of one micrometer, see page 4, lines 35-44, and page 6, lines 7-10. By describing the particles as capable of substantial homogeneous dispersion, EP 0261844 implicitly describes a dispersion of the particles in aqueous media which is homogeneous, i.e., the particles themselves substantially similar or substantially identical parts or elements in accordance with the lexical sense of substantially homogeneous. Thus EP 0261844 defines particulate whose stabilizing properties fall within the scope of those described herein. The quantitative characteristics of which are not explicitly mentioned. Indeed, in EP 051274 and US 4334575, both of which are incorporated in the application by reference and required in the search report, the term *monodisperse* is used loosely to denote the particles having approximately the same size. In EP 051274, the particles have a diameter less than 10⁻⁶ m, in US 4334575 (column 2, lines 4-6) and in DE 4334232 (example 17, line 44) the term *monodisperse* is used for particles having a standard deviation of 10%. Therefore, the diverse solutions proposed for the problem (previously known and disclosed) no longer conform to a general inventive concept. The search has been reinitiated. As a result, to the first prior Art disclosed.

第4-501959 (18)

國家調查報告

四百四十九

國 稅 同 意 請 求

卷之三

The newest addition to our family of coffee houses is the new Starbucks®-style coffee shop in downtown Webster, NC 27093. The Webster Starbucks® offers a variety of Starbucks® coffee, espresso, tea, muffins, pastries, sandwiches, salads, soups, and more. Stop by for a taste of Webster's newest coffee shop.

This survey being done by the Bureau of Economic Analysis is for the present congressional budget. It will also include information about foreign trade, the cost of living, and the gross national product. The Bureau of Economic Analysis is the best source for data on economic activity and money supply for the purposes of information.

For more details, please click here or visit [different sections of the **Information Pages**](#). Page 42/24

Режим отключения или включение	Причина изменения	Причина изменения	Причина изменения	Причина изменения
19-А- 4120123	22-06-08	AT-19- AU-19- AU-19- CA-19- DI-19- DI-19- DU-19-	268169 553010 454210 136675 61-19-75 01-19-75 415857	22-06-08 14-07-01 16-07-01 16-07-01 01-10-01 18-07-01
19-А- 4724936	22-11-08	US-19- US-19- US-19- US-19- US-19- US-19- US-19- US-19- US-19- US-19- US-19- US-19- US-19- US-19- US-19-	455000 150000 150000 000000 000000 427867 499591 599513 599513 599513 599513 599513 599513 599513	19-11-08 19-11-08 19-11-08 19-11-08 19-11-08 22-09-08 07-09-08 07-09-08 07-09-08 07-09-08 22-09-08 22-09-08 22-09-08 22-09-08 22-09-08
19-А- 4756042	05-11-08	GP-19- VJ-19- AU-19- AU-19- AU-19- AU-19- AU-19- AU-19- AU-19- AU-19- AU-19- AU-19- AU-19- AU-19- AU-19-	671300 451315 451315 552104 552104 552104 552104 552104 552104 552104 552104 552104 552104 552104 552104 552104	28-07-02 29-07-02 29-07-02 06-10-02 06-10-02 06-10-02 06-10-02 06-10-02 06-10-02 06-10-02 06-10-02 06-10-02 06-10-02 06-10-02 06-10-02
19-А- 4776629	04-10-08			
19-А- 4992946	20-11-08	AU-19-	1501000	12-12-01
19-А- 1937623	05-10-08	AU-19- AU-19-	2316289 6100000	16-10-01 03-11-01

REVIEW ARTICLE — *Structure and function of the bacterial flagellar motor* — 1073

第1頁の続き

Gmelin, Gl.

卷之四

序言整理番号

C 12 9

2 6307-4B

www.w3.org/

DATAWIRELESS.COM | 800.828.1722

©1988年11月21日イギリス(GB)08827159.8

©1988年11月21日イギリス(GB)08827180.6

©1988年1月21日イギリス(GB)03827166.3

©1988年11月21日イギリス(GB)08827167.1

©1988年3月22日イギリス(GB)8906043.5